

Interferenza da biotina negli immunodosaggi: raccomandazioni del Gruppo di Studio SIBioC sulla Variabilità Extra-Analitica (SIBioC-VEA)

Giuseppe Lippi^{1,2}, Graziella Bonetti^{1,3}, Annalisa Modenese^{1,4}, Andrea Padoan^{1,5}, Davide Giavarina^{1,6},
per il GdS SIBioC sulla Variabilità Extra-Analitica (SIBioC-VEA)

¹Gruppo di Studio sulla Variabilità Extra-Analitica (SIBioC-VEA)

²Sezione di Biochimica Clinica, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona, Verona, Italia

³Laboratorio Centrale di Chimica Clinica, ASST – Spedali Civili, Brescia, Italia

⁴Istituto Clinico Città Studi (ICCS) Milano, Italia

⁵Dipartimento Strutturale Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedale Università di Padova, Italia

⁶Dipartimento della Diagnostica, Laboratorio Analisi, Ospedale San Bortolo, Vicenza, Italia

ABSTRACT

Biotin interference in immunoassays: recommendations of the SIBioC Working Group on Extra-Analytical Variability (WG-VEA). Biotin is a water-soluble vitamin, which participates to a vast array of metabolic pathways involving fatty acids, carbohydrates and amino acids metabolism. This vitamin is also capable to form high-affinity bonds with various molecules, including streptavidin and avidin, which are essential components of many immunoassays based on the principle of biotin-streptavidin or biotin-avidin binding. In patients assuming high doses of biotin, therefore, some competitive and non-competitive immunoassays may exhibit falsely increased and falsely decreased test results, respectively, with magnitude of interference depending on biotin concentration in the test sample and on specific vulnerability of the immunoassay. With the aim to provide some expert guidance for identifying, preventing and managing biotin interference in clinical laboratory practice, this document contains a series of consensus recommendations endorsed by the Working Group on Extra-Analytical Variability of the Italian Society of Clinical Chemistry and Clinical Molecular Biology (SIBioC). Briefly, the most important recommendations encompass local evaluation of possible biotin interference, routine history taking on biotin intake for both inpatients and outpatients, informing clinicians on potentially biotin-sensitive immunoassays, sample retesting 24-48 hours after the last biotin administration, along with possible consideration to add a note in the laboratory report highlighting the methods more vulnerable to biotin interference. Routine biotin measurement in all samples is currently discouraged.

GENERALITÀ SULLA BIOTINA

La biotina è una vitamina B idrosolubile, nota anche come vitamina B7, vitamina H o coenzima R. Essa è coinvolta in un ampio spettro di processi metabolici, sia nell'uomo e sia in altri organismi, principalmente nel metabolismo di acidi grassi, carboidrati ed amminoacidi (1). Le caratteristiche strutturali della biotina la rendono idonea a legarsi ad altre molecole (processo noto con il termine di "biotinilazione"), alterandone minimamente le proprietà strutturali o antigeniche. La biotina è facilmente disponibile e completamente assorbibile mediante ingestione di una vasta gamma di alimenti di origine animale e vegetale, mentre una piccola parte può essere anche assorbita a seguito di sintesi batterica nell'intestino. Malgrado non siano stati ancora stabiliti con certezza i livelli raccomandati di assunzione della vitamina, alcune indicazioni riportano valori di 0,01-0,02

mg/die alla nascita, 0,02-0,03 mg/die in età pediatrica e 0,03-0,10 mg/die in età adulta. Le restrizioni caloriche sono raramente causa di deficit clinicamente significativi (2). Il picco di assorbimento si registra solitamente dopo 1-3 ore dall'ingestione, il catabolismo è principalmente renale, e la molecola in circolo ha una emivita solitamente compresa tra 8 e 16 ore, mentre il periodo minimo di *wash-out* dalla somministrazione sembra essere di circa 48 ore. Sono noti due metaboliti attivi della molecola, la bisnorbiotina e la biotina sulfossido; quest'ultima mantiene la capacità di legare streptavidina, sebbene con minore affinità rispetto al composto di origine (3).

I sintomi della carenza di biotina comprendono convulsioni, ipotonia, atassia, dermatite, perdita di capelli, ritardo mentale, acidosi chetoacida, aciduria organica e possibili malformazioni fetali (4). Malgrado il deficit di biotina sia estremamente raro (circa 1:60000

Corrispondenza a: Giuseppe Lippi, Sezione di Biochimica Clinica Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata. Piazza A Stefani, 1, 37126, Verona. E-mail: giuseppe.lippi@univr.it

Ricevuto: 18.02.2019

Revisionato: 26.02.2019

Accettato: 27.02.2019

Pubblicato on-line: 07.03.2019

DOI: 10.19186/BC_2019.010

nati vivi) (5), questa vitamina fa comunemente parte di composti multivitaminici. A dispetto di evidenze del tutto aneddotiche, o addirittura discutibili, la supplementazione di biotina come integratore alimentare è oggi particolarmente in voga per il trattamento di alcune patologie, soprattutto cutanee, a carico delle unghie (aumento di spessore, resistenza e flessibilità), dei capelli (prevenzione o trattamento dell'alopecia) o della pelle (maggiore elasticità, trattamento di eritemi, dermatite seborroica e acne) (6). Altrettanto inconcludenti sono le evidenze in merito ai possibili benefici della supplementazione con biotina nei pazienti con sclerosi multipla (7). Le dosi di biotina variano moltissimo in funzione del preparato commerciale (da 5 mg ad oltre 100 mg), ma sono comunque considerevolmente maggiori di quelle suggerite (8).

INTERFERENZA DA BIOTINA NEGLI IMMUNODOSAGGI

Come descritto in precedenza, la biotina ha la capacità di formare legami ad alta affinità con varie molecole, tra le quali la streptavidina (ed in misura minore) l'avidina, che sono componenti essenziali di molti immunodosaggi, basati per l'appunto sul principio del legame biotina-streptavidina o biotina-avidina (9). In breve, negli immunodosaggi competitivi gli anticorpi mono- o poli-clonali vengono coniugati con biotina e fatti reagire con una miscela di campione del paziente (tipicamente siero o plasma) contenente l'antigene nativo ed un reagente contenente il medesimo antigene coniugato con un tracciante. L'anticorpo biotinilato è quindi catturato da una fase solida, contenente streptavidina (Figura 1). A concentrazioni crescenti di antigene nativo presente nel campione, la quantità di anticorpo legato all'antigene coniugato con tracciante che viene successivamente catturato dalla streptavidina presente sulla fase solida decresce in parallelo, generando quindi un segnale di reazione finale (misurato con tecniche enzimatiche classiche, fluorescenti o chemiluminescenti) che è inversamente proporzionale alla concentrazione dell'antigene nativo presente nel campione del paziente (Figura 1). Comprensibilmente, in pazienti che abbiano assunto alte dosi di biotina (soprattutto come supplemento alimentare), il legame tra anticorpo biotinilato e la streptavidina in fase solida viene sostanzialmente ridotto (per competizione tra biotina di origine alimentare e biotina coniugata all'anticorpo), generando pertanto un segnale inferiore rispetto a quello che si sarebbe potuto registrare in assenza della biotina assunta come supplemento nutrizionale, e producendo infine una concentrazione misurata dell'antigene falsamente aumentata (Figura 1). Negli immunodosaggi non competitivi (anche noti come *sandwich immunoassays*), in cui l'anticorpo coniugato con biotina compete solo con l'antigene nativo, l'interferenza è comprensibilmente di segno opposto, e cioè una riduzione del segnale per interferenza da biotina si traduce in una falsa diminuzione della concentrazione

dell'antigene in misura (Figura 2) (10,11).

L'ampiezza dell'interferenza varia ovviamente in funzione della quantità di eccesso di biotina nel campione e della soglia di interferenza dello specifico immunodosaggio. Nondimeno, è ragionevole supporre che maggiore sia la concentrazione della biotina libera nel campione, maggiore sia l'interferenza (12). Malgrado la ragione non sia ancora chiara, va altresì ricordato che non tutti gli immunodosaggi basati sul principio biotina-streptavidina sono equamente vulnerabili a questo tipo di interferenza (3). A questo proposito giova menzionare le conclusioni di un recente articolo di revisione sistematica della letteratura, che ha valutato la sensibilità di diversi immunodosaggi all'interferenza da biotina (3). In breve sintesi, sono molteplici le determinazioni immunochimiche eseguite su strumentazione Roche Diagnostics (piattaforme Cobas e411, Elecsys, Cobas e602, Modular E170; Indianapolis, IN, USA) per cui è documentata una possibile interferenza da biotina (assunzione alimentare da 25 a 300 mg una tantum). Essi comprendono la frazione libera T3 (fT3), T4 (fT4), ormone paratiroideo (PTH), tireotropina (TSH), 25OH vitamina D, cortisolo, ormone follicolo-stimolante (FSH), ormone luteinizzante (LH), prolattina (PRL), C-peptide, estradiolo, deidroepiandrosterone solfato (DHEAS), testosterone, e ferritina. Per alcune determinazioni (ad esempio la 25OH vitamina D) l'interferenza è già presente per una assunzione di biotina >10 mg, per la maggior parte delle determinazioni a dosaggi >100 mg. Per quanto concerne la strumentazione Siemens Healthcare Diagnostics (Tarrytown, NY, USA), l'interferenza è stata dimostrata in 6 dei 75 immunodosaggi disponibili sulla piattaforma ADVIA Centaur, tra cui ciclosporina, DHEAS, folati, HBc IgM e troponina cardiaca I (cTnI). Per quanto riguarda la piattaforma Dimension Vista, gli esami potenzialmente alterati sono cTnI, TSH e fT3 (per concentrazione plasmatica di biotina $\geq 300 \mu\text{g/L}$), digossina, NT-pro-BNP, TSH, progesterone ed estradiolo (per concentrazione plasmatica di biotina $\geq 400 \mu\text{g/L}$). Per quanto concerne Beckman Coulter (piattaforme Access e Dxl; Brea, CA), sono 4 i metodi per cui è stata descritta una potenziale interferenza da biotina (assunzione di 30 mg, corrispondente ad una concentrazione plasmatica di $\geq 100 \mu\text{g/L}$), e cioè fT4, T3 totale, T4 totale, GI Monitor (CA 19-9 antigen), tireoglobulina. A differenza dei metodi descritti in precedenza, per Abbott (Abbott Park, IL, USA) non è descritta alcuna interferenza da biotina fino ad una concentrazione plasmatica pari a $100 \mu\text{g/L}$; ciò è imputabile al fatto che il metodo utilizzato sulle piattaforme Abbott non utilizza il principio biotina-streptavidina. Infine, per Ortho Clinical Diagnostics (piattaforma Vitros 5600; Rochester, NY, USA), la possibile interferenza da biotina ad una concentrazione plasmatica di $2,5 \mu\text{g/L}$ è stata descritta per cTnI, a concentrazione plasmatica di $5 \mu\text{g/L}$ per TSH ed estradiolo, a concentrazione plasmatica di circa $10 \mu\text{g/L}$ per FSH, LH, PRL, gonadotropina beta umana cronica ($\beta\text{-HCG}$), antigene carcinoembrionario (CEA), antigene

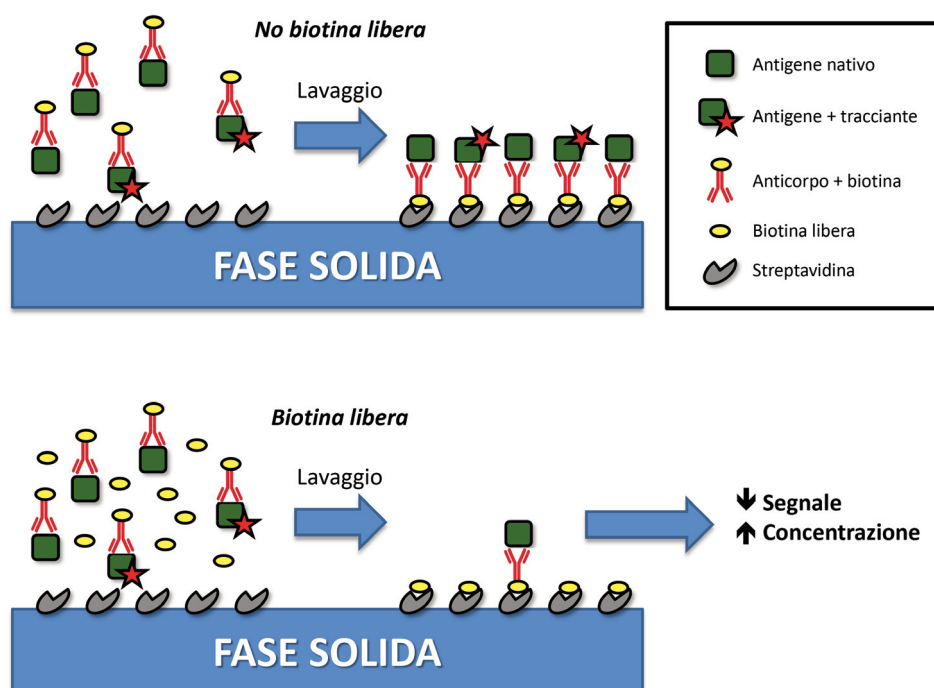


Figura 1
 Possibile interferenza da biotina negli immunodosaggi competitivi

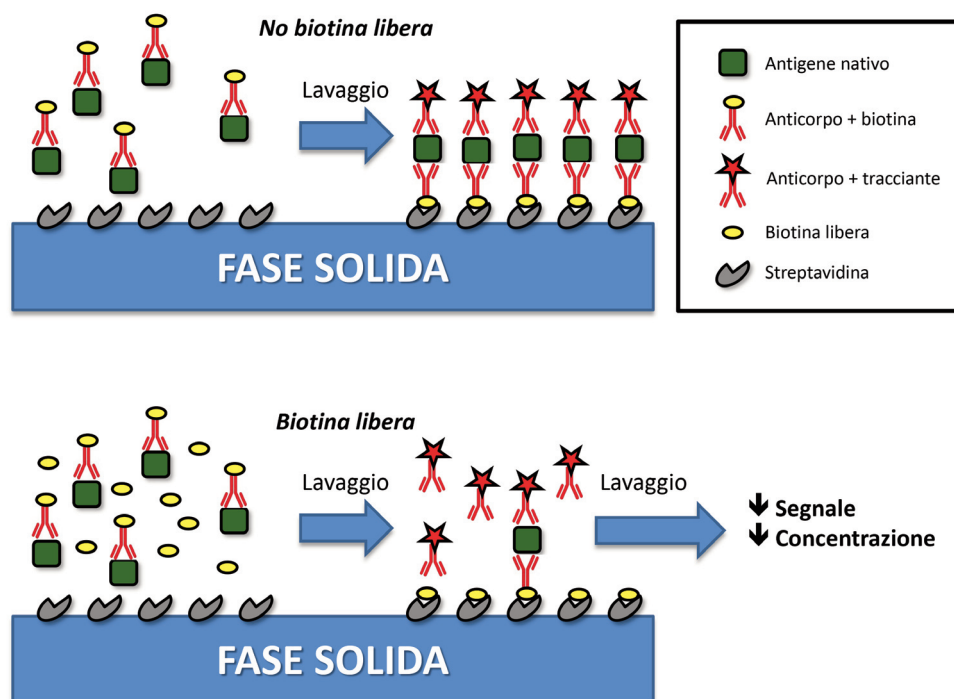


Figura 2
 Possibile interferenza da biotina negli immunodosaggi non-competitivi

prostatico specifico (PSA), ferritina, folati, progesterone e testosterone.

Alla luce di queste evidenze, la *US Food and Drug Administration* (FDA) ha recentemente emanato una raccomandazione in forma di *safety alert*, atta ad avvertire laboratoristi, clinici e pazienti sulla possibile interferenza da biotina in alcuni esami di laboratorio (13). Purtroppo non esiste ad oggi alcun metodo validato, e certificato dai produttori, per rimuovere l'interferenza da biotina nel campione in esame. I produttori stanno alacremente lavorando per riformulare i loro immunodosaggi affinché questo tipo di interferenza possa essere eliminata, ma non è ragionevole attendersi che ciò possa trovare una rapida conclusione (3).

La determinazione della biotina, soprattutto nei casi sospetti, può essere una possibile strategia. La biotina può essere determinata con vari metodi, alcuni complessi (estrazione e quantificazione microbiologica con *Lactobacillus plantarum*, *avidin-binding assays*, *high pressure liquid chromatography*), altri più semplici (enzimatici fluorimetrici, colorimetrici, ELISA). Nondimeno, la determinazione di routine di questa molecola in tutti i campioni per cui siano previsti esami con possibile interferenza e successiva soppressione dei risultati comporterebbe non solo un aumento considerevole di costi, ma soprattutto un allungamento del tempo di risposta (TAT). Va inoltre ricordato che i

metodi oggi disponibili in commercio sono in grado di determinare concentrazioni di biotina in intervalli di concentrazione per lo più fisiologici, mentre sono altamente imprecisi per elevate concentrazioni dell'analita, come quelle risultanti da elevata supplementazione (ad esempio >100 ng/mL una tantum).

RACCOMANDAZIONI DEL GRUPPO DI STUDIO

Le raccomandazioni del Gruppo di Studio sulla Variabilità Extra-Analitica di SIBioC-Medicina di Laboratorio (SIBioC-VEA) in merito alla possibile interferenza da biotina negli immunodosaggi sono state redatte in accordo al Programma Nazionale per le Linee Guida (PNLG) (14). Esse sono state quindi definite sulla base di un sistema di "grading" corrispondente alla "forza delle raccomandazioni", espresso in lettere maiuscole (forza decrescente da A ad E). Un questionario contenente le raccomandazioni è stato inviato mediante posta elettronica a tutti i membri del GdS SIBioC-VEA, ai quali è stato chiesto di definire il grado di forza (da A ad E) in merito alle singole raccomandazioni. Il grado finale della raccomandazione è stato ottenuto calcolando la media dei singoli giudizi, dopo riconversione della forza di grading in un risultato numerico (A=1; B=2; C=3; D=4; E=5). Nello specifico, esami con media finale <1,5 sono

Tabella 1

Sintesi delle raccomandazioni del Gruppo di Studio sulla Variabilità Extra-Analitica di SIBioC-Medicina di Laboratorio (GdS VEA) in merito alla possibile interferenza da biotina negli immunodosaggi

Raccomandazione	Forza
Valutare localmente, utilizzando i dati della letteratura o le note inviate dai produttori dei test, la possibile interferenza da biotina negli immunodosaggi in uso al laboratorio.	A
Informare i clinici sul tipo di immunodosaggi in uso al laboratorio che possono essere sensibili ad interferenza da biotina.	A
Informare i clinici sulla direzione dell' interferenza da biotina (positiva o negativa) degli immunodosaggi in uso al laboratorio.	B
Comunicare ai clinici di valutare sempre in anamnesi se i pazienti facciano uso di biotina come supplemento alimentare, soprattutto ad alto dosaggio (>5 mg/die).	A
Comunicare ai clinici che in presenza di risultati degli immunodosaggi non compatibili con la clinica è necessario ripetere accuratamente l'anamnesi, volta ad escludere l'assunzione di biotina da parte del paziente.	A
All'atto del prelievo, il prelevatore deve sempre interrogare il paziente sull'utilizzo di integratori alimentari a base di biotina.	B
In pazienti che utilizzino biotina ad alto dosaggio il prelievo deve essere eseguito ad almeno 24-48 ore dall'ultima somministrazione.	A
La segnalazione sull'uso di integratori alimentari a base di biotina deve sempre accompagnare il campione biologico in Laboratorio.	B
Quantificare la concentrazione di biotina in tutti i campioni in cui siano previsti test con possibile interferenza.	D
Aggiungere una nota in refertazione ad esami potenzialmente influenzati da biotina, specificando "POSSIBILE INTERFERENZA PER ALTE DOSI DI BIOTINA".	B

stati classificati come grado "A", media compresa tra 1,5 e <2,5 come grado "B", media compresa tra 2,5 e <3,5 come grado "C", e media compresa tra 3,5 e <4,5 come grado "D" e media $\geq 4,5$ come grado "E". La sintesi finale delle raccomandazioni del GdS VEA è descritta in Tabella 1.

In sintesi, le raccomandazioni di consenso scaturite sono le seguenti:

Grado A:

- valutare localmente la possibile interferenza da biotina negli immunodosaggi in uso al laboratorio;
- informare i clinici sugli immunodosaggi del laboratorio sensibili ad interferenza da biotina;
- comunicare ai clinici di valutare sempre in anamnesi se i pazienti facciano uso di biotina come supplemento alimentare, soprattutto ad alto dosaggio;
- comunicare ai clinici che in presenza di risultati degli immunodosaggi non compatibili con la clinica è necessario escludere l'assunzione di biotina da parte del paziente;
- rieseguire il prelievo ad almeno 24-48 ore dall'ultima somministrazione in pazienti che utilizzino biotina ad alto dosaggio.

Grado B:

- informare i clinici sulla direzione dell'interferenza da biotina;
- il prelevatore deve sempre interrogare il paziente sull'utilizzo di integratori alimentari a base di biotina;
- la segnalazione sull'uso di integratori alimentari a base di biotina deve sempre accompagnare il campione biologico in Laboratorio;
- il laboratorio può valutare se aggiungere una nota in refertazione ad esami potenzialmente influenzati da biotina, specificando "POSSIBILE INTERFERENZA PER ALTE DOSI DI BIOTINA".

Secondo le raccomandazioni di consenso scaturite, il GdS non ritiene invece ragionevole quantificare la concentrazione di biotina in tutti i campioni in cui siano previsti test con possibile interferenza.

È auspicato di tutti i componenti del GdS VEA che le suddette raccomandazioni di consenso possano rappresentare una utile base al fine di sviluppare analoghe misure per minimizzare i possibili effetti sui pazienti dell'interferenza da biotina sui test immunochimici di laboratorio.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano i membri del GdS SIBioC-VEA che hanno contribuito a formulare le raccomandazioni: Adriano Anesi, Giuseppe Banfi, Anna Rosa Corno, Maria Luisa De Angelis, Anna Ferrari, Maria Loredana Frassanito, Giovanni Lombardi, Barbara Marcon, Valentino Miconi, Bruno Milanese, Martina Montagnana, Benedetto Morelli, Rocco Negri, Elisa Piva, Brunetta Porcelli, Laura Roli, Ernesto Trabuio, Roberto Vettori.

BIBLIOGRAFIA

1. Fiume MZ; Cosmetic ingredient review Expert Panel. Final report on the safety assessment of biotin. *Int J Toxicol* 2001;20 Suppl 4:1-12.
2. Zemleni J, Mock DM. Biotin biochemistry and human requirements. *J Nutr Biochem* 1999;10:128-38.
3. Colon PJ, Greene DN. Biotin interference in clinical immunoassays. *J Appl Lab Med* 2018;3:941-5.
4. Zemleni J, Hassan YI, Wijeratne SS. Biotin and biotinidase deficiency. *Expert Rev Endocrinol Metab* 2008;3:715-24.
5. Zemleni J, Wijeratne SS, Hassan YI. Biotin. *Biofactors* 2009;35:36-46.
6. Soleymani T, Lo Sicco K, Shapiro J. The infatuation with biotin supplementation: is there truth behind its rising popularity? A comparative analysis of clinical efficacy versus social popularity. *J Drugs Dermatol* 2017;16:496-500.
7. Evans E, Piccio L, Cross AH. Use of vitamins and dietary supplements by patients with multiple sclerosis: A Review. *JAMA Neurol* 2018;75:1013-21.
8. Kummer S, Hermesen D, Distelmaier F. Biotin treatment mimicking Graves' disease. *N Engl J Med* 2016;375:704-6.
9. Dundas CM, Demonte D, Park S. Streptavidin-biotin technology: improvements and innovations in chemical and biological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013;97:9343-53.
10. Chun KY. Biotin interference in diagnostic tests. *Clin Chem* 2017;63:619-20.
11. Li J, Wagar EA, Meng QH. Comprehensive assessment of biotin interference in immunoassays. *Clin Chim Acta* 2018;487:293-8.
12. Li D, Radulescu A, Shrestha RT, et al. Association of biotin ingestion with performance of hormone and nonhormone assays in healthy adults. *JAMA* 2017;318:1150-60.
13. Food and Drug Administration. FDA warns that biotin may affect some lab test results. <https://labtestsonline.org/news/fda-warns-biotin-may-affect-some-lab-test-results> (ultimo accesso: ottobre 2018).
14. Istituto Superiore di Sanità. Manuale metodologico – Come produrre, diffondere e aggiornare raccomandazioni per la pratica clinica. http://old.iss.it/binary/lgm2/cont/Manuale_PNLG.1234439852.pdf. (ultimo accesso ottobre 2018).